

## L'HETEROCHROMATINE, du chromosome à la protéine

\*

### I Le concept d'hétérochromatine

### II Deux types d'hétérochromatine

#### II.1 L'hétérochromatine constitutive

#### II.2 L'hétérochromatine facultative

### III Propriétés de l'hétérochromatine

#### III.1 L'hétérochromatine est condensée :

#### III.2 L'ADN de l'HC est de réplication tardive :

#### III.3 L'ADN de l'HC est méthylé :

#### III.4 Les histones de l'HC sont hypo-acétylées :

#### III.5 Les histones de l'HC sont méthylées sur la lysine 9:

#### III.6 L'HC est transcriptionnellement inactive:

#### III.7 L'HC ne participe pas à la recombinaison génétique:

#### III.8 L'hétérochromatine a l'instinct grégaire:

### IV Facteurs impliqués dans l'hétérochromatinisation

#### IV.1 Les séquences répétées en tandem, un grand nombre de fois.

#### IV.2 La méthylation de l'ADN

#### IV.3 L'hypo-acétylation des Histones

#### IV.4 La méthylation de H3-K9

#### IV.5 Les protéines HP1

#### IV.6 Les ARNs nucléaires

### V Fonctions de l'hétérochromatine

#### V.1 Rôle de l'HC dans l'organisation des domaines nucléaires.

#### V.2 Rôle de l'HC dans la fonction centromérique

#### V.3 Rôle de l'HC dans la répression génique (régulation épigénétique)

### VI Maladies de l'hétérochromatine

#### VI.1 Maladies de l'hétérochromatine constitutive

#### VI.2 Maladies de l'hétérochromatine facultative

### Conclusion

\*

## I Le concept d'hétérochromatine

### Définition de la chromatine:

Chez les eucaryotes, contrairement aux procaryotes, l'ADN est empaqueté sous forme d'un complexe nucléo-protéique appelé "**chromatine**", qui porte le message héréditaire. Elle est localisée dans un noyau et apparaît organisée en plusieurs entités distinctes que sont les chromosomes.

### Le concept d'hétérochromatine

En 1928, basé sur des observations exclusivement histologiques, Emil Heitz définit *l'hétérochromatine* (HC) comme les segments de chromosome qui apparaissent très condensés et très colorés dans le noyau interphasique. En fait, la chromatine se présente comme un enchevêtrement de fibres dont le diamètre varie, non seulement au cours du cycle cellulaire, mais aussi en fonction des régions chromosomiques observées.

L'euchromatine active est constituée d'une fibre dont le diamètre correspond à celui d'un nucléosome, segment d'ADN double brin enroulé autour de 8 molécules d'histones identiques deux à deux, H2A, H2B, H3, et H4. Dans l'euchromatine inactive, cette fibre peut s'enrouler en un solénoïde grâce aux histones H1. Ce solénoïde est davantage organisé grâce à des interactions avec des *protéines non-histones* (topoisomérase II, la scaffold protein 2 ou SC2, les lamines...). En ce qui concerne l'hétérochromatine telle que nous l'avons définie, la fibre qui la compose est encore plus condensée, apparaît souvent en agrégats, et implique de nombreuses autres protéines et notamment les protéines HP1 (heterochromatin protein 1).

## II Deux types d'hétérochromatine

Il existe deux types d'hétérochromatine, l'HC *constitutive* et l'HC *facultative*, qui présentent quelques rares différences, essentiellement liées à l'ADN qu'elles contiennent. La richesse en ADN satellite conditionne, en effet, la permanence ou la réversibilité de l'hétérochromatine, son polymorphisme éventuel et ses propriétés tinctoriales (**Table I**).

HC constitutive	HC facultative
stable	réversible
contient de l'ADN satellite	enrichie en séquences LINES
polymorphisme +	polymorphisme -
bandes C +	bandes C -

INSERM U491

**Table1 : Propriétés permettant de différencier l'hétérochromatine constitutive de l'hétérochromatine facultative.**

### II.1 L'hétérochromatine constitutive

- L'HC *constitutive* contient un ADN tout à fait particulier, appelé ADN satellite et constitué de séquences courtes et répétées en tandem un très grand nombre de fois : *ADN alpha-satellite*, *ADN satellite I*, *II* et *III*. Ces séquences d'ADN satellite peuvent se replier sur elles mêmes et pourraient jouer un rôle important dans la structure très compacte que présente l'HC constitutive.
- L'HC *constitutive* est stable et garde ses propriétés d'hétérochromatine à toutes les étapes du développement et dans tous les tissus.
- L'HC *constitutive* est très polymorphe probablement du fait de l'instabilité de l'ADN satellite. Ce polymorphisme peut concerner aussi bien la taille, que la localisation de l'hétérochromatine et n'entraîne apparemment aucun effet phénotypique.
- L'HC *constitutive* est fortement colorée par la technique des bandes C, ce qui pourrait résulter de la renaturation très rapide de l'ADN satellite après dénaturation.

### II.2 L'hétérochromatine facultative

- L'HC *facultative* est caractérisée par la présence de séquences répétées de type *LINES*. De telles séquences, dispersées dans le génome, pourraient favoriser la propagation d'une structure chromatiniennne condensée.
- L'HC *facultative* est réversible, son « état hétérochromatique » dépendant du stade de développement ou du type cellulaire étudié. L'X inactif (Corps de Barr) dans les cellules somatiques femelles et la vésicule sexuelle (VS) inactive au stade pachytène de la méiose masculine sont deux exemples d'HC *facultative*.
- L'HC *facultative*, n'étant pas particulièrement enrichie en ADN satellite, ne présente pas de polymorphisme.
- L'HC *facultative* n'est jamais colorée par la technique des bandes C.

### III Propriétés de l'hétérochromatine

En dépit des quelques différences que nous venons de voir, l'HC *constitutive* et l'HC *facultative* ont des propriétés très similaires.

#### III.1 L'hétérochromatine est condensée :

C'est la définition même de l'hétérochromatine et elle s'applique aussi bien à l'HC *constitutive* qu'à l'HC *facultative*. Cette forte condensation entraîne une intense chromophilie et la rend inaccessible à la DNase 1 et aux enzymes de restriction en général.

#### III.2 L'ADN de l'HC est de réplication tardive :

L'incorporation de différents analogues des nucléotides montre que l'ADN contenu dans l'HC, *facultative* et *constitutive*, a une réplication tardive. La réplication tardive de l'HC résulte d'une part de sa forte condensation qui empêche la machinerie de réplication d'accéder facilement à l'ADN, et d'autre part de sa localisation dans un domaine nucléaire excentré, pauvre en éléments actifs.

#### III.3 L'ADN de l'HC est méthylé :

- L'ADN de l'HC *constitutive* est très méthylé sur les cytosines. Ainsi, un anticorps anti-5-méthyl cytosine colore très fortement toutes les régions d'HC *constitutive*.
- Pour ce qui est de l'HC *facultative*, la méthylation de l'ADN est plus discrète. Des enzymes de restriction, sensibles à la méthylation, permettent cependant de déceler une forte méthylation des îlots CpG, spécifiquement localisés dans les régions régulatrices des gènes.

#### III.4 Les histones de l'HC sont hypo-acétylées :

Les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles, portant sur leurs extrémités N-terminales et susceptibles d'influer sur l'activité génétique de la chromatine.

- L'hypo-acétylation des histones, essentiellement sur les lysines, est associée à une chromatine inactive. Au contraire, des histones hyper-acétylées traduisent une chromatine active.
- L'acétylation/de-acétylation des histones est un mécanisme tout à fait essentiel de la régulation de l'expression des gènes. De nombreux facteurs de transcription ont été montrés avoir une activité, soit d'**Histone Acétyl Transférase (HAT)**, soit d'**Histone De-ACétylases (HDAC)**.

#### III.5 Les histones de l'HC sont méthylées sur la lysine 9:

La méthylation de l'histone H3 lysine 9 (H3-K9) a très récemment été impliquée dans les processus d'hétérochromatinisation du génome, aussi bien de l'HC *constitutive* que l'HC *facultative*.

#### III.6 L'HC est transcriptionnellement inactive:

- Contrairement à la drosophile, l'HC *constitutive* humaine ne contient pas de gènes, et l'incorporation d'uridine tritiée dans une culture cellulaire ne montre aucun marquage de l'hétérochromatine.
- L'HC *facultative* est relativement pauvre en gènes et ces gènes ne sont généralement pas transcrits dans un contexte hétérochromatique.

### III.7 L'HC ne participe pas à la recombinaison génétique:

- Il est admis qu'à la méiose, l'HC *constitutive* ne participe pas à la recombinaison génétique. Il n'y a pas d'appariement préalable entre les régions hétérochromatiques homologues, probablement à cause du polymorphisme, caractérisant les régions hétérochromatiques, qui rend difficile, voire impossible, un tel appariement. L'HC *constitutive* a de plus un effet répresseur sur la recombinaison des régions euchromatiques adjacentes.
- Pour ce qui est de l'HC *facultative*, elle ne participe pas à la recombinaison méiotique quand elle est sous forme inactive.

### III.8 L'hétérochromatine a l'instinct grégaire:

L'étude de différents organismes montre que l'HC *constitutive* a une réelle tendance à s'agréger en interphase.

- Dans les larves de drosophile, les centromères des chromosomes polytènes, riches en hétérochromatine, peuvent s'agréger pour former les chromocentres pendant l'interphase.
- Chez la souris, le nombre de blocs hétérochromatiques que l'on observe dans les noyaux interphasiques est toujours inférieur au nombre de régions hétérochromatiques visualisées sur les chromosomes métaphiques.
- Chez l'homme, les bras courts des chromosomes acrocentriques, essentiellement formés d'hétérochromatine, sont fréquemment associés dans le noyau interphasique avec d'autres chromosomes portant un large bloc d'HC, comme les chromosomes 1, 9 ou 16.

Cette tendance de l'hétérochromatine à s'agréger semble être fortement liée à la présence de séquences d'ADN satellite, mais pourrait impliquer aussi d'autres séquences.

## IV Facteurs impliqués dans l'hétérochromatinisation

Certaines observations ont permis de mieux cerner les éléments ayant un rôle important dans la formation d'hétérochromatine, qu'elle soit *constitutive* ou *facultative*.

### IV.1 Les séquences répétées en tandem, un grand nombre de fois.

- L'ADN satellite visualisée par FISH correspond parfaitement à celle de l'hétérochromatine *constitutive*. De plus, de telles séquences d'ADN satellite ont en effet la particularité de se courber et de se replier sur elles mêmes, et ceci pourrait jouer un rôle important dans la structure très compacte que présente l'HC constitutive.
- Néanmoins, il n'y a pas que l'ADN satellite qui soit concerné. Ainsi chez les plantes, la drosophile, mais aussi chez la souris, certains transgènes multicopies sont peu ou pas exprimés, alors même qu'ils ne sont pas soumis à l'effet répresseur d'un centromère.

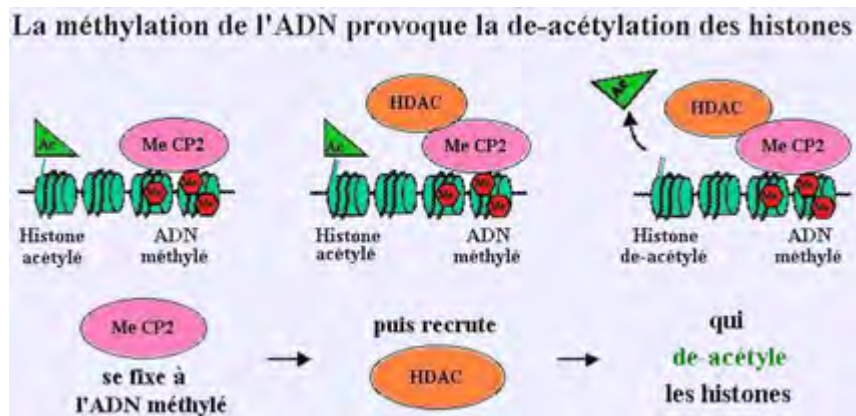
Ces différentes observations suggèrent que la répétition d'une séquence d'ADN, en tandem, un grand nombre de fois, est capable de générer, *à elle seule*, la formation d'hétérochromatine. De telles séquences répétées permettraient d'atteindre un degré plus élevé de compactage de la chromatine, formant ainsi des structures particulières. Ces structures pourraient alors être reconnues par des protéines spécifiques comme les protéines HP1, et l'ensemble conduirait à la formation d'une chromatine d'un ordre supérieur.

### IV.2 La méthylation de l'ADN

Les larges répétitions de transgènes ne conduisent pas toutes à une inactivation transcriptionnelle de celui-ci. Le *silencing* induit par les répétitions en tandem apparaît être lié à la présence de séquences d'ADN procaryote, riches en CpG, susceptibles d'être méthylées. Alors, la composition en bases des séquences répétées en tandem pourrait donc jouer un rôle non négligeable dans

la formation d'hétérochromatine.

- De façon intéressante, il a récemment été montré que la methyl binding protein MeCP2, qui normalement se fixe à l'ADN contenant des cytosines méthylées, est capable de recruter des histones de-acétylases (Fig1). La méthylation de l'ADN pourrait ainsi induire une de-acétylation des histones et favoriser l'hétérochromatinisation.
- Néanmoins, la méthylation de l'ADN n'est pas un élément indispensable à la formation d'hétérochromatine. Elle pourrait être un élément de stabilisation. Chez les marsupiaux, en effet, l'X inactif n'est pas méthylé et il est beaucoup moins stable que chez les mammifères euthériens.



**Fig1: La méthylation de l'ADN provoque une dé-acétylation des histones, modification qui caractérise les histones à la fois dans l'hétérochromatine et dans l'euchromatine.**

MeCP2 se fixe à l'ADN méthylée et recrute une HDAC qui dé-acétyle les histones. (Ac = Acetyl ; Me = Methyl ; MeCP2 = Methyl-CpG binding Protein 2 ; HDAC = Histone De-Acetylase).

### IV.3 L'hypo-acétylation des Histones

Nous avons vu que l'hypo-acétylation des histones était une caractéristique de la chromatine silencieuse qu'il s'agisse ou non d'hétérochromatine. Ainsi, un blocage de la de-acétylation des histones par adjonction de trichostatine A induit une hyper-acétylation des histones, qui a pour conséquence une ouverture de la structure chromatinienne.

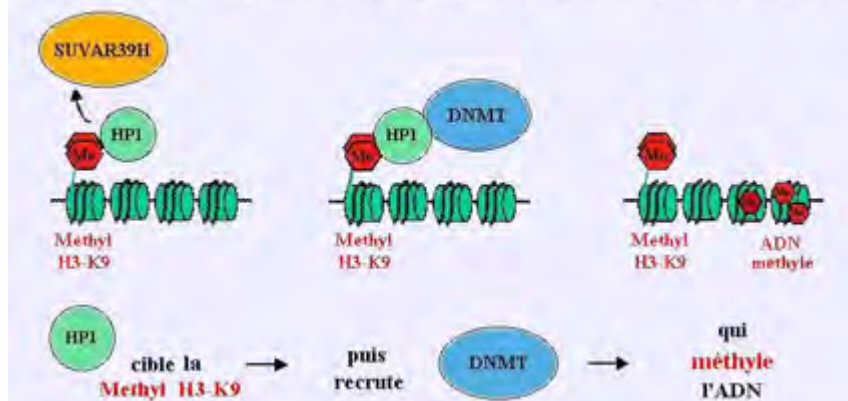
- En fait, l'acétylation des lysines annule la charge positive des histones, diminuant ainsi les forces d'attraction avec la charge négative du phosphate de l'ADN, et conduisant à une ouverture plus large de la chromatine.
- Au contraire, la de-acétylation des lysines libère les charges positives et favorise ainsi une attraction étroite avec l'ADN, conduisant à la formation d'une chromatine condensée.

### IV.4 La méthylation de H3-K9

La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 est une modification épigénétique, très récemment démontrée comme étant impliquée dans les processus d'hétérochromatinisation, aussi bien dans l'HC *constitutive* que sur l'X inactif. L'enzyme responsable de la méthylation est l'histone méthyltransférase SUV39H1.

- Sur la lysine 9 de H3, acétylation et méthylation semblent être mutuellement exclusives. Ainsi, chez la drosophile, l'histone H3 méthyltransférase Suv39h est associée à une histone de-acétylase, ce qui suggère un *mécanisme moléculaire unique*, permettant de convertir directement une lysine 9 acétylée en une lysine 9 méthylée.
- La méthylation de H3-K9 crée en outre un site de haute affinité pour la protéine de l'hétérochromatine HP1. La co-immunoprécipitation de Suvar39h avec HP1 permet de proposer un mécanisme d'hétérochromatinisation qui serait basé sur l'interaction entre ces 2 protéines et la lysine 9.
- Enfin, chez *Neurospora crassa*, il a récemment été montré que la méthylation de H3-K9 pouvait entraîner la méthylation de l'ADN. (Fig2)

## La méthylation de l'histone H3-K9 provoque la méthylation de l'ADN



**Fig 2: La méthylation de l'histone H3-K9 provoque la méthylation de l'ADN, modification qui caractérise l'ADN dans l'hétérochromatine ou dans l'euchromatine réprimée.**

SUVAR39H est une méthyltransférase qui méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3. Une telle méthylation crée un site pour la protéine de l'hétérochromatine HP1 qui recrute une DNA Méthyl Transférase (DNMT), capable de méthyle le CpG de l'ADN. (Me = Methyl ; Methyl H3-K9 = Methyl sur Lysine 9 de l'Histone H3 ; HP1 = Heterochromatin Protein 1).

#### IV.5 Les protéines HP1

Les protéines HP1 semblent jouer un rôle tout à fait particulier dans l'organisation de l'hétérochromatine. C'est essentiellement l'étude de la *variégation par effet de position* (effet PEV) chez la drosophile, puis l'étude des transgènes chez la drosophile et la souris qui ont permis de mieux connaître le rôle joué par les protéines HP1.

- Chez la drosophile, la protéine HP1 est codée par le gène *Su(var)205*, suppresseur de variégation capable de modifier l'effet PEV. La variégation par effet de position peut être décrite comme suit : des gènes, habituellement localisés dans l'euchromatine active sont, à la suite d'un réarrangement chromosomique, placés à proximité d'une région centromérique, donc hétérochromatique. La chromatine nouvellement réprimée devient beaucoup plus compacte et commence à s'associer avec des protéines HP1, habituellement confinées aux centromères. De plus, les gènes contenus dans cette chromatine sont réprimés.
- Chez la souris, l'insertion d'un transgène à proximité d'un centromère peut entraîner des conséquences similaires.

Il est intéressant de noter que même dans les cas où un transgène est réprimé, non pas en raison d'un effet centromérique, mais en raison de sa forte répétition, là encore on retrouve des protéines HP1 associées à la chromatine réprimée.

Les protéines HP1 semblent constituer le maillon indispensable à la formation d'hétérochromatine et pourraient jouer un rôle *d'organisateur de domaine chromatinien*. Ces protéines HP1 seraient capables de reconnaître des structures particulières réalisées par l'appariement et/ou l'association des séquences d'ADN répétées. De plus, grâce au chromodomaine (CD) et au chromoshadow domaine (CSD), elles seraient capables d'établir secondairement des liaisons avec un grand nombre d'autres protéines.

#### IV.6 Les ARNs nucléaires

- Il est déjà bien établi que certains ARN nucléaires sont capables d'intervenir dans la formation de l'HC *facultative*. Ainsi, les transcripts du gène *XIST* (**X**inactif **S**pecific **T**ranscripts) jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'inactivation facultative d'un chromosome X, dans les cellules somatiques des mammifères femelles.
- Certains résultats récents, obtenus chez la souris, suggèrent que des transcripts nucléaires pourraient aussi être impliqués dans la formation d'HC *constitutive*. Dans cette espèce, l'HC centromérique est caractérisée par la présence d'une forte concentration d'histone H3-K9 méthylée et de protéines hétérochromatiques HP1, qui sont rapidement délocalisées après incubation avec de la RNase A. Ceci suggère donc qu'un ARN nucléaire pourrait être un composant structural essentiel de l'HC *constitutive*.

## V Fonctions de l'hétérochromatine

On s'est longtemps demandé si l'hétérochromatine avait un rôle précis dans le génome humain car son polymorphisme important ne semblait pas avoir de conséquence fonctionnelle ou phénotypique.

### V.1 Rôle de l'HC dans l'organisation des domaines nucléaires.

- L'hétérochromatine et l'euchromatine occupaient des domaines nucléaires différents : l'HC est généralement localisée à la périphérie du noyau et accolée à la membrane nucléaire. La chromatine active occupe, au contraire, une position centrale.
- La localisation préférentielle de l'HC contre la membrane nucléaire pourrait être due à l'interaction de la protéine HP1 avec le récepteur de la lamine B, composant intégral de la membrane nucléaire interne.
- La localisation périphérique de l'HC, concentre les éléments actifs vers l'intérieur du noyau, permettant à l'Euchromatine active de se répliquer et d'être transcrite avec une efficacité maximum.

### V.2 Rôle de l'HC dans la fonction centromérique

Dans la plupart des eucaryotes, les centromères sont enrobés d'une masse non négligeable d'hétérochromatine. Il a été proposé que l'HC centromérique soit nécessaire pour assurer la cohésion des chromatides sœurs et permettre une disjonction normale des chromosomes mitotiques.

- Chez la levure *Saccharomyces Pombe*, l'homologue de la protéine HP1, Swi6, est tout à fait nécessaire à la cohésion efficace des chromatides sœurs pendant la division cellulaire.
- De plus, des expériences de délétion de l'ADN satellite montrent qu'une large région de repeats d'ADN satellite est indispensable pour que la fonction centromérique soit correcte.

Il est supposé que l'HC centromérique pourrait créer, *de facto*, un compartiment en augmentant la concentration locale du variant d'histone centromérique CENP-A et en favorisant l'incorporation de CENP-A plutôt que d'histone H3 pendant la réplication.

### V.3 Rôle de l'HC dans la répression génique (régulation épigénétique)

L'expression génique peut être régulée à deux niveaux:

- Tout d'abord au niveau local et c'est *la régulation de la transcription*, grâce à la formation de complexes locaux de transcription. Ce niveau implique des séquences d'ADN relativement petites liées à des gènes individuels.
- A un niveau plus global, et c'est alors plutôt *la transcriptabilité* qui est contrôlée. Il implique des séquences beaucoup plus grandes, représentant un large domaine chromatinien, qui peut être soit sous un état actif, soit sous un état inactif. L'hétérochromatine serait impliquée dans le contrôle de la *transcriptabilité* du génome. Ainsi, des gènes habituellement localisés dans l'euchromatine peuvent être réduits au silence lorsqu'ils sont placés à proximité d'un domaine hétérochromatique.

#### Mécanisme d'inactivation en *cis*:

A la suite d'un réarrangement chromosomique, une région euchromatique peut être juxtaposée à une région hétérochromatique. Dans les cas où le réarrangement a enlevé *certaines barrières normales* protégeant l'euchromatine, la structure hétérochromatique devient capable de se propager en *cis* à l'euchromatine qui la jouxte, inactivant ainsi les gènes qu'elle contient. Ce mécanisme a été observé dans la variéation par effet de position (PEV) chez la *Drosophile* ou encore dans l'inactivation de certains transgènes chez la souris.

#### Mécanisme d'inactivation en *trans*:

Au cours de la différenciation cellulaire, certains gènes actifs sont susceptibles d'être transposés dans un domaine nucléaire

hétérochromatique, ce qui entraîne leur inactivation. Un tel mécanisme a été proposé pour expliquer la co-localisation, dans les noyaux de lymphocytes, de la protéine Ikaros et des gènes dont elle régule l'expression avec de l'hétérochromatine centromérique.

## VI Maladies de l'hétérochromatine

### VI.1 Maladies de l'hétérochromatine constitutive

Ces maladies résultent généralement d'une altération des processus de différenciation cellulaire.

- Elles peuvent être **constitutionnelles** comme *le syndrome ICF* ou *le syndrome de Roberts* :  
Le syndrome ICF associe une Immunodéficiency, une instabilité des Centromères et une dysmorphie Faciale (Immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies). Il s'agit d'une maladie récessive, rare, liée à des mutations du gène DNMT3B, DNA methyl transférase. Les ADN satellites II et III riches en G-C sont particulièrement déméthylés, ce qui provoque une ségrégation anormale des chromatides sœurs, la formation de figures multiradiales, des délétions, des micronoyaux...
- Elles peuvent être **acquises** : dans de nombreux cancers, des anomalies de l'hétérochromatine constitutive ont été mises en évidence, portant soit sur l'ADN soit sur les protéines de l'hétérochromatine.
  - Dans les lymphomes non hodgkiniens et le myélome multiple ont notamment été montrées des anomalies de la constriction secondaire du chromosome 1, et ces anomalies miment les anomalies retrouvées dans le syndrome ICF. Il a en effet été montré l'existence d'une hypométhylation globale du génome, associée plus particulièrement à une hypométhylation de l'ADN satellite II.
  - Dans le cancer du sein métastatique, a été démontrée une diminution de la protéine HP1 alpha, cette protéine étant normalement localisée dans les régions centromérique des chromosomes.

### VI.2 Maladies de l'hétérochromatine facultative

- Elles peuvent résulter du défaut d'inactivation d'un chromosome X dans les cellules somatiques chez la femme (mutation dans le gène XIST), et entraînera l'expression de maladies récessives liées au chromosome X chez la femme.
- Elles peuvent résulter d'un défaut de condensation de la vésicule sexuelle, dans les cellules germinales mâles et entraîner une stérilité due à l'arrêt de la méiose au stade pachytène.

## CONCLUSION

En conclusion, l'hétérochromatine, bien qu'apparemment amorphe et isolée en périphérie du noyau, semble jouer un rôle tout à fait essentiel dans l'organisation et la fonction du génome. Tout au long de cet exposé nous avons essentiellement présenté les caractéristiques liées à l'HC, qu'elle soit *constitutive* ou *facultative*. Nous avons montré que les propriétés de l'HC *constitutive* ne différaient pas fondamentalement de celles de l'HC *facultative*. Il apparaît maintenant évident que les mécanismes impliqués dans l'hétérochromatinisation facultative, qui sont des mécanismes épigénétiques, sont identiques à ceux intervenant dans la répression de l'euchromatine (silencing) en général.

**Contributors : Marie-Geneviève Mattei and Judith Luciani\***

\*Judith Luciani est subventionnée par la Fondation Electricité de France